

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

## ⑪ 公開特許公報 (A)

昭63-60938

⑤Int.Cl.\*

A 61 K 37/02  
C 12 N 9/64

識別記号

ACB

厅内整理番号

8615-4C  
8717-4B

⑩公開 昭和63年(1988)3月17日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全 8 頁)

⑪発明の名称 修飾組織型プラスミノーゲン活性化因子およびその製造方法

⑪特 願 昭61-205201

⑪出 願 昭61(1986)9月2日

⑪発明者 錦坂 勝美 神奈川県中郡二宮町富士見ヶ丘2-19-1  
 ⑪発明者 橋田 逸郎 神奈川県小田原市下新田225  
 ⑪発明者 濱口 好孝 神奈川県小田原市千代465-6  
 ⑪発明者 西田 浩子 神奈川県横浜市戸塚区公田町1272-18  
 ⑪出願人 明治乳業株式会社 東京都中央区京橋2丁目3番6号

## 明細書

## 1.発明の名称

修飾組織型プラスミノーゲン活性化因子および  
その製造方法

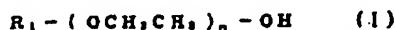
## 2.特許請求の範囲

## (1) 式 (1)



(式中  $R_1$  は炭素数 1 ~ 5 個のアルキル基を、  $n$  は 40 ~ 140 の整数を示す) で示されるポリエチレン glycole の末端水酸基を組織型プラスミノーゲン活性化因子のアミノ酸残基のアミノ基と結合し得るよう活性化し、該活性化ポリエチレン glycole を組織型プラスミノーゲン活性化因子のアミノ酸残基のアミノ基に活性基を介して結合させることを特徴とする修飾組織型プラスミノーゲン活性化因子の製造方法。

## (2) 式 (1)



(式中  $R_1$  は炭素数 1 ~ 5 個のアルキル基を、  $n$  は 40 ~ 140 の整数を示す) で示されるポリ

エチレン glycole の末端水酸基を組織型プラスミノーゲン活性化因子のアミノ酸残基のアミノ基と結合し得るよう活性化し、該活性化ポリエチレン glycole を組織型プラスミノーゲン活性化因子のアミノ酸残基のアミノ基に活性基を介して結合させることを特徴とする修飾組織型プラスミノーゲン活性化因子の製造方法。

## 3.発明の詳細な説明

## 〔産業上の利用分野〕

本発明は、組織型プラスミノーゲン活性化因子分子内のアミノ酸残基のアミノ基に結合し得るよう活性化したポリエチレン glycole を活性基を介して結合するととにより組織型プラスミノーゲン活性化因子の生理活性の少なくとも本質的な部分を保持しつつ、血中半減期が延長されかつ抗原性を消失せしめた修飾組織型プラスミノーゲン活性化因子およびその製造方法に関する。

## 〔従来の技術〕

近年医学分野において静脈蛋白質を非経口的に投与して治療するいわゆる静脈投法に関する研究

が盛んである。

酵素法の欠点は酵素法に用いられる酵素蛋白質が、その由来がヒト以外の場合には、直接ヒトに投与した場合生体内の免疫系を刺激して抗体を産生させ場合によつては重篤な症状をひきおこすことと、ヒト由来を含めた酵素蛋白質が酵素法の目的で生体に投与されると生体内における生理活性が非常に早く消失してしまうことである。

このためこれらを医薬品として用いるに際しては、その活性を保持したまま、生体内生理活性保持時間を延長させ、さらにその抗原性を弱めさせる必要があり、その目的で酵素蛋白質のアミノ酸残基と有機化合物を結合させたいわゆる化学修飾酵素蛋白質の研究が数多く行なわれている(稻田ら 生化学、第52巻、第12号、1225-1267(1980))。

血栓溶解作用を有するいわゆるプラスミノーゲン活性化因子は、その免疫学的特徴に基づいてウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子および組織型プラスミノーゲン活性化因子に区別されて

いる。これを介して分子量750~10000のポリエチレングリコール残基を結合させることにより、抗血栓作用を示す酵素活性を保持しつつ抗原性を著しく消失させたストレプトキナーゼが得られたと報告されている(特開昭57-118789号)。[発明が解決しようとする問題点]

ウロキナーゼおよびストレプトキナーゼは、組織型プラスミノーゲン活性化因子(以下t-PAと称す)とくらべて纖維素(フィブリン)に対する親和性が低いため、溶解したい纖維素と結合しているプラスミノーゲンを優先的に活性化することができない。即ち無効阻にプラスミノーゲンを活性化するため生成するプラスミンの多くは血栓に到達する前に中和されてしまう。このため血栓溶解剤として使用した場合所望の結果を得るために、大量に投与する必要があり内出血等の副作用の可能性を生じる。またストレプトキナーゼは強度に免疫原性であり、高抗体価の患者には投与できない。

一方t-PAは、纖維素(フィブリン)に対する親和性が高いため、纖維素と結合しているプラスミノーゲンを優先的に活性化する。このようなt-PAのすぐれた

いる。これらのプラスミノーゲン活性化因子はいずれも不活性前駆体プラスミノーゲンをプラスミンに変換する作用をもつエンドプロテアーゼであり、その効能は心筋梗塞、肺塞栓症、胸部静脈血栓症、末梢動脈閉塞症およびその他の血栓症によぶ。

既に市販されている血栓溶解作用を有する2種の蛋白質剤ウロキナーゼとストレプトキナーゼについても一般に行なわれている蛋白の化学修飾を応用することにより免疫原性の消失化、血中半減期の延長化および生理活性の保持が研究されている。

ヒト由来ウロキナーゼの場合、リジン残基およびN末端アミノ基に平均分子量5000のポリエチレングリコール誘導体を活性カッティング剤を用いることにより化学修飾し、これを正常家兎に静注した場合ウロキナーゼの血中半減期が延長されたと報告されている(特開昭58-96026号)。またストレプトキナーゼの場合も分子中のアミノ基の5~10%の水素原子に対しトリアジ

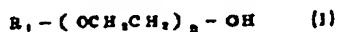
特性は血栓症の治療に効果的であるが、生体内投与された場合t-PAは、複雑な構造を持つ(Collen et al. Thromb. Haemostas 52 24-26(1984))が故に諸々の生体内インヒビターの阻害を受けやすいこと、又t-PA自体代謝が極めて速いことなどから血中半減期が2~3分と極めて短い(C. Korpela et al. Thromb. Haemostas 46 658-661(1981))。本研究者の研究によると血中半減期は、諸々の実験条件によつて速いニュージーランド白兎にネンブタール注射液を耳静脈より注射し全身麻酔をかける方法では血中半減期が1本錠t-PAでは約66秒、2本錠t-PAでは約39秒と更に短い。

しかしながらt-PAの生体内投与上の前述の欠点を解消すべく、その安定化のための化学修飾に関する報告は現在までのところない。

以上の理由からt-PAの生体内における血中半減期の延長化、免疫原性の消失化のためにt-PAを修飾することの実用的意義は極めて大きい。[問題点を解決するための手段]

本発明者らは継続研究の結果、I-PAのポリペプチド鎖上に突出したリジン残基のアミノ基に平均分子量5000のポリエチレングリコールを結合させた修飾I-PAを白兎(ニュージーランド産)に静注した場合その血中半減期が約8倍に延長され、且つ少なくとも10%以上の残存活性を保持したまま1時間以上失活しないことを見いたした。

すなわち、本発明は、式(I)



(式中  $R_1$  は炭素数1～5個のアルキル基を、 $n$  は40～140の整数を示す)で示されるポリエチレングリコールの末端水酸基を組織型プラスミノーゲン活性化因子のアミノ酸残基のアミノ基と結合し得るよう活性化し、該活性化ポリエチレングリコールを組織型プラスミノーゲン活性化因子のアミノ酸残基のアミノ基に活性基を介して結合してなる修飾組織型プラスミノーゲン活性化因子を提供することにある。

本発明におけるI-PAは、被生物培養系または

細胞培養系により產生されプロテアーゼ部分を含み、生体組織中に存在するI-PAと極めてよく似た生理活性を有する物質を全て包含する。即ちI-PAは遺伝子操作による産物、ヒト内皮細胞、ヒト子宮細胞などの正常細胞、ヒトメラノーマ、乳癌細胞などの腫瘍細胞およびこれらのセルライン化されたものから得られたもの全てを含む。

本発明におけるI-PAの理化学的性質は次の通りである。

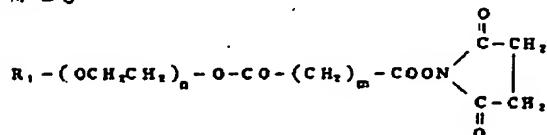
①分子量 62000～73000

②作用および基質特異性

不活性前駆体プラスミノーゲンをプラスミンに変換しフィブリリンを溶解する。市販の酵素製剤ウロキナーゼにくらべてフィブリリンに対する強い親和性を示す。合成基質S-2288(第一化学、II-D-Isoleucyl-L-prolyl-L-arginine-p-nitroanilide dihydrochloride)での $K_m$ は $3.6 \times 10^{-4} \text{ M}$ 、 $V_{max} 3.16 \text{ pmol/min. I.U.}$ である。

③至適pH 7～11

カルボキシル基とN-ヒドロキシスクシニルイミドとをエステル結合させて以下の式で示されるN-ヒドロキシスクシニルイミドポリグリコートを得る。



式中  $R_1$  は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチルまたはペンチル基を示し、このうち特にメチル基が好ましい。

式中  $-CO - (CH_2)_n - CO -$  は、架橋性残基を示し、 $n$  は1～4の整数であり、具体的には、マロール基( $-CO - CH_2 - CO -$ )、スクシニル基( $-CO - (CH_2)_2 - CO -$ )、グルタリル基( $-CO - (CH_2)_3 - CO -$ )またはアジビル基( $-CO - (CH_2)_4 - CO -$ )等があげられる。

これらの架橋性残基は、その一端をPEGの末端水酸基の残存銀基と結合し、他の一端をI-PA分子内のアミノ基残基とのうちリジン残基のε-アミノ基

④安定pH 4.5～11

⑤作用適温 30～45℃

⑥温度耐性 90分の加熱処理で50℃までは殆ど失活しない。

⑦紫外線吸収スペクトル

280 nmに極大吸収あり。

⑧溶剤に対する溶解度

水あるいはリン酸緩衝液などの塩類溶液に対する溶解度 50 μg/ml

それ以外の場合は溶解促進剤が必要。

⑨物質の性状 褐結性粉末は白色粉末。

⑩呈色反応 PAS反応で糖蛋白に特有なビンク色を呈す。

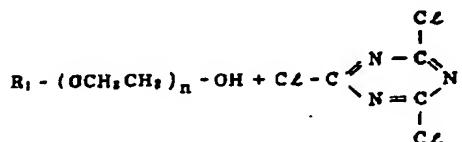
⑪等電点 pH 7.5～8.0

本発明の活性化ポリエチレングリコール(以下活性化PEGと称す)は、以下に示す自体公知の方法で合成される。

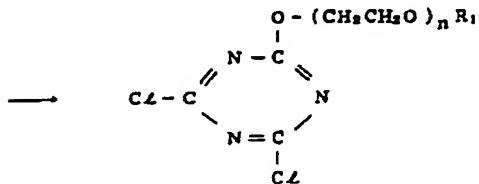
式(I)で示されるポリエチレングリコール(以下PEGと称す)の水酸基を脂肪族ジカルボン酸(炭素数3～6)でエステル化し、次いで末端の

およびN末端の $\alpha$ -アミノ基と結合するものである。

この他にはPEGとハロゲン化シアヌル、例えば塩化シアヌルとを反応させ活性化させる方法 (Inada et al. Immunochemistry 12, 899-902 (1975)) があげられ反応式は次式で示される。



(式中  $R_1$  および  $n$  は前述とおなじ)



2-アルコキシPEG-4,6-ジクロロ-1,3,5-トリアジン

以下略

具体的に聞いてこれを活性なプラスミンに変換するセリンプロテアーゼ部分を有している (Collie et al. Nature 301 214-221 (1983))。従つて  $\epsilon$ -PAを修飾する場合、前述の活性部位を出来るだけ保持するよう修飾条件を設定しなくてはならない。

しかしながら、 $\epsilon$ -PAの活性を維持しつつ、血中半減期を延長させる修飾試薬の選定および修飾条件の設定が望ましいことであるが、一般に行なわれている酵素蛋白の修飾においても非免疫性を与える為にある程度の活性を犠牲にせざるを得ないのが現状である。 $\epsilon$ -PAの修飾においても $\epsilon$ -PAが複雑な構造を有し、リシン残基の $\epsilon$ -アミノ基の局所環境の多様性から選択的な修飾を行なうことは非常に難しい。

活性化PEGによる $\epsilon$ -PAの修飾方法を以下に例示する。

$\epsilon$ -PA 1モル当たり  $N$ -ヒドロキシスクシニルイミドペリグリコートと  $2.41 \times 10^3 \sim 1.27 \times 10^4$  倍モルとをpH 6.5~9.0、好ま

更にはPEGの末端ヒドロキシル基をクロル酢酸、次いでシアゾメタンと反応させカルボキシメチルエステルを得、ヒドロシンで処理してアシルアシドの付加された活性化PEGを得る方法(特公昭56-23587号)等を用いてよい。

本発明に用いる活性化PEGは、前述のもの以外に中性付近で反応性が高く反応条件が緩和でリシン残基の $\epsilon$ -アミノ基に対する選択性が高く人体に投与した時副作用のない条件を満足するものであれば使用できる。

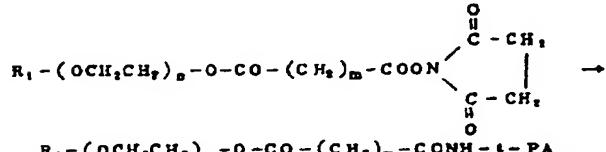
次にこうして得られた活性化PEGと $\epsilon$ -PAとの修飾反応は、 $\epsilon$ -PAの活性が極力失われない条件下で行なわなければならず通常の化学反応とは区別される。

$\epsilon$ -PAの場合フィブリンと親和性を示すクリングル(Kringle)領域とプラスミノーゲンに特

しくはpH 6.5~7.5のホク酸緩衝液又はリン酸緩衝液中で室温以下で反応させる。この時のPEG平均分子量は1900~5000の範囲が好ましい結果を与える。

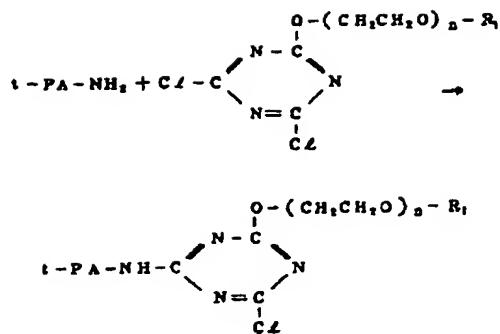
$\epsilon$ -PA-NH<sub>2</sub>

+



このようにして得られた修飾 $\epsilon$ -PAの精製は、 $\epsilon$ -PAの生理活性を低下させない公知の蛋白精製法、例えば透析、膜外ろ過、ゲルろ過等を適宜組み合わせて行なう。

他の活性化PEGとして例えば塩化シアヌルの付加された2-アルコキシPEG-4,6-ジクロロ-1,3,5-トリアジンを用いる場合、 $\epsilon$ -PAと該活性化PEGとをホク酸緩衝液中で反応させ、反応終了後未反応の活性化PEGを公知の方法で取り除き修飾 $\epsilon$ -PAを得る。



## 〔発明の効果〕

こうして得られた修飾 L-PA は、生体内インヒビターの影響を受けにくく、かつ血中の活性持続時間が延長された血栓溶解剤として有効である。

得られた修飾 L-PA は、L-PA の酸難溶解活性を少なくとも 15% 以上保持しており物理化学的に安定で生体に投与した場合の血中半減期は、L-PA のそれと比べて約 8 倍に延長される。

また未修飾 L-PA が約 20 分で完全に活性を失うのに対し修飾 L-PA はその活性の血中保持効果において少なくとも 10% 以上の残存活性を 1 時

間以上保持しうる。

本発明による修飾 L-PA は、血栓症、例えば心筋梗塞、肺塞栓症、胸部静脈血栓症、末梢動脈閉塞症等の治療に安全にかつ有効に使用できる。

本発明の修飾 L-PA を医薬品として使用する場合、血管内、特に血栓を生じた部位に投与することができるが、通常は静脈内投与するのが望ましい。

組成物の添加物としては、塩化ナトリウム、マニシット、ブドウ糖等の等張引剤、マニシット、アルブミン、ゼラチン、亜硫酸水素ナトリウム等の安定剤等が適当である。投与量は患者の体重、年齢、症状、経過等によるが 50 μg ~ 500 mg の範囲で投与ができる。静脈内投与の方法としては、注射による投与がのぞましいが、点滴静注等の方法も可能である。

## 〔実施例〕

以下に実施例を示す。

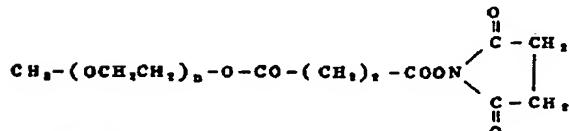
## 〔実施例 1〕 活性化 PEG 勝導体による L-PA の修飾

## ① 精製 L-PA

ヒト横紋筋肉腫変異株 KYM-E (明治乳業株式会社所有株) (以下 KYM-E と称す) 培養上清より亜鉛キレートカラム、抗 L-PA モノクローナル抗体アフィニティーカロマトグラフィー、セファクリール S-200 カラムクロマトグラフイーにより精製したもので蛋白濃度は 26.9 μg/ml, 0.3 M NaCl, 0.01% Tween 80 含有 1.0 mM リン酸緩衝液 pH 6.5 中に溶解してあるものを使用した。

## ② 修飾試験

平均分子量 5000 の PEG のコハク酸エステルを N-ヒドロキシスクシニルイミドにより活性化した N-ヒドロキシスクシニルイミドボリグリコート (日本油脂) (以下活性化 PEG<sub>5000</sub> と称す) を使用した。このものは次式であらわされる。



## ③ 修飾方法

精製 L-PA (分子量約 70000, 3995 IU/ml) 7.5 ml を 1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) に対して 4℃にて一昼夜透析、緩衝液の交換を行なつた。

次に該 L-PA 液に活性化 PEG<sub>5000</sub> (日本油脂) を 2.4 ~ 1.0 回にわけて添加し 4℃にて 2 時間反応させた。この時の L-PA および活性化 PEG<sub>5000</sub> の濃度は各々  $5.76 \times 10^{-4}$  M および  $4.37 \times 10^{-2}$  M であつた。

この反応液を 0.02% (w/v) Tween 80 と 0.15 M NaCl を含有する 1.0 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) で透析し、9 ml に濃縮した。この時の活性は、3467 IU/ml であつた。

反応終了後得られた修飾 L-PA について高速

液体クロマトグラフィー(スーパーロース12, Pharmacia社)カラムを用いた蛋白質の分子量測定標準曲線(Calibration curve)からその分子量を推定すると約120000であつた。i-PAの分子量が約70000であることから約10個のPEG<sub>5000</sub>が架橋性残基を介してi-PAのポリペプチドのリシン残基およびN末端アミノ基に結合した。

[実施例2] Bawoo株由来i-PAの修飾

Bawoo株より精製したi-PA(米国American Diagnostics社)について色々な修飾条件により実施した。修飾試験は実施例1と同様の活性化PEG<sub>5000</sub>を使用した。結果を表1に示す。

表1

i-PA(2本組) 試料	活性化PEG			試料i-PA 平均分子量
	μg/ml	モル濃度	モル濃度	
1 1.83	2.7×10 <sup>-7</sup>	5000	960	3.2×10 <sup>-3</sup>
2 1.83	2.6×10 <sup>-7</sup>	5000	240	8.0×10 <sup>-3</sup>
3 1.83	2.7×10 <sup>-7</sup>	5000	240	8.0×10 <sup>-3</sup>
4 1.87	2.7×10 <sup>-7</sup>	5000	200	4.0×10 <sup>-3</sup>
5 1.83	2.7×10 <sup>-7</sup>	1900	525	7.9×10 <sup>-3</sup>

試料のi-PAの分子量は、試料1 = 68000, 2 = 70000, 3 = 68000, 4 = 70000, 5 = 69000である。

[試験例1] KYM-E由来の修飾i-PAの  
血中半減期および血中活性保持効  
果試験

体重2.8~3.2kgの雄ニュージーランド白兎にネンブタール注射液(30mg/kg、大日本製薬)で全身麻酔し、固定後耳静脈より実施例1で得た修飾i-PA(3467I.U./ml)を2ml投与し、投与後1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 45, 60分で、3.8%クエン酸ナトリウム0.3mlを予め添加しておいた試験管に経時的に採血(各2.7ml/回)した。コントロールとしてKYM-E由来i-PA(4550I.U./ml)を2ml同様にして兎に投与し、経時的に採血(2.7ml/回)した。

こうして得られた全血3mlを10分間遠心分離(14°C, 3500rpm)し血を氷冷蒸留水で10倍に希釈した後2%酢酸でpH5.9に調整し、4°Cにて30分静置後遠心分離しEuglobulin分画沈殿を緩衝液A(0.1M NaCl, 0.25%セラチン

0.01%Tween 80含有5.0mMリン酸緩衝液、pH7.75)に溶解した。

これらのEuglobulin分画についてi-PAの活性測定をRijken( Rijken et al. J. Biol. Chem. 256: 7035-7041 (1981) )の方法を改良したファイブリングクロット溶解時間法により行なつた。ファイブリングクロットは、2.4mlヒトファブリノーゲン0.5ml、標準クロキナーゼ液あるいはEuglobulin分画液0.1ml、0.3mlヒトプラスミノーゲン0.05ml、40NIH単位/mlトロンビン0.05mlを順次添加して形成した。なおすべての試液は緩衝液Aで希釈調製した。トロンビンの添加直後よりストップウォッチを始動し37°Cの恒温水槽中で2分間インキュベートしファイブリングクロットを完成させた後、直径3.2mmのナイロンボールをファイブリングクロットの上に静置しナイロンボールが試験管の底面に到達するまでの経過時間を測定した。

各濃度のウロキナーゼを用いた場合のフィブリン溶解時間(秒)を測定し、ウロキナーゼ単位と溶解時間を両対数グラフにプロットし検量線を作製した。

*Euglobulin* 分画中の残存活性はウロキナーゼの検量線から希釈倍数を乗じて算出しウロキナーゼ国際単位(IU)で表示した。

ゼロ時における残存活性を100%とした場合の各時間における残存活性の%を第1図に示した。

修飾t-PAはゼロ時における残存活性を100%とした場合未修飾t-PAより明らかに延長され、t-PAの半減期が約40秒だったのに対し修飾t-PAの半減期は約320秒と約8倍延長された。

又修飾t-PAは、少なくとも10%以上の活性を保持したまま60分以上失活せずに血中に存在したのに対し、未修飾t-PAは約20分で完全に失活した。

活性化PEGの修飾は、t-PAの血中での長

時間の活性保持に極めて有効であつた。

【試験例2】 修飾条件による修飾t-PAの血中半減期

実施例2で得られた各々の修飾t-PAについて血中半減期を試験例1と同じ方法で白色家兎に投与し毎時的に採血し、*Euglobulin* 分画を得た。

これらの*Euglobulin* 分画について各々のt-PA活性をフィブリンクロット溶解時間法の改良法によつて測定した。結果を表2に示す。

表 2

試料	残存活性率%	血中半減期 $t_{1/2}$	PEG 平均結合数
1	15.1	183秒	12
2	26.4	192	9
3	19.3	174	10
4	28.1	260	8
5	32.9	136	10

表2の結果から修飾t-PAの血中半減期は未修飾t-PAの血中半減期39秒と比較して大幅に延長された。残存活性は、少なくとも15%以上保持されていた。

【試験例3】 修飾t-PAの抗原性

KYM-E由来t-PAを135nM含有する0.1Mホウ酸緩衝液(pH 8.5)500μLに活性化PEG5000を0.5~2.5mg粉末状態で添加し4℃にて2時間反応させた。

反応終了後、サンドイッチ型酵素免疫測定法(以下EIAと称す)により活性化モノメトキシPEGを添加した修飾t-PAおよび未修飾t-PAについて抗原性を測定した。

EIAは、試料液を1mM MgCl<sub>2</sub>、0.15M NaCl、0.1%牛血清アルブミン、0.1%Na<sub>3</sub>を含有する10mMリン酸緩衝液(pH 7.0)で20倍、200倍に希釈したものと測定試料とした。

この試料液150μLに抗t-PA抗体(兔IgG)結合ポリスチレンビーズ(直径3.2mm)を1個加え37℃で4時間インキュベートし、更に

1夜反応させた。反応後0.9%NaClでビーズを3回洗浄しβ-ガラクトシダーゼ標識抗体(兔Fab')2000単位加え37℃にて6時間インキュベートした。反応後0.9%NaClで3回洗浄し、ビーズに結合したβ-ガラクトシダーゼ活性を4-メチルウンベリフェリール-β-D-ガラクトシドを基質とし反応させ、生成した4-メチルウンベリフェロンの発光強度を励起波長360nm、発光波長450nmで測定した。酵素反応は37℃にて20分間行なつた。第2図にその結果を示す。

修飾t-PAは感筋による抗原性の消失がみられ、1.0mM活性化PEG-E酵素体標識修飾t-PAではほぼ100%消失していた。0.2mMでも50%以下になつていた。

この事は、本発明による修飾法がt-PAの抗原性を消失させるのに極めて有効であることを示すものである。

4. 図の簡単な説明

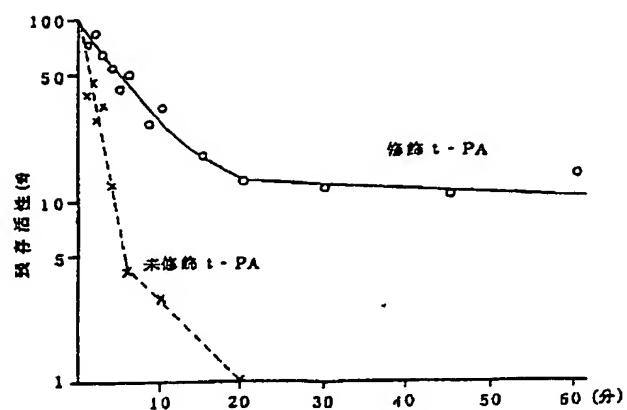
第1図はKYM-E由来修飾t-PAの兎に

第 1 図

ける血中プラスミノーゲンアクチベーター活性の  
経時変化を示す。第2図はPEG各濃度での修飾  
におけるEIAによる残存抗原性の変化を示す。

以 上

出 論 人 明 治 乳 葉 株 式 会 社



第 2 図

